

# Parecidos, pero no iguales: ¿qué papel juegan los D-amino ácidos en ambientes poli-microbianos?

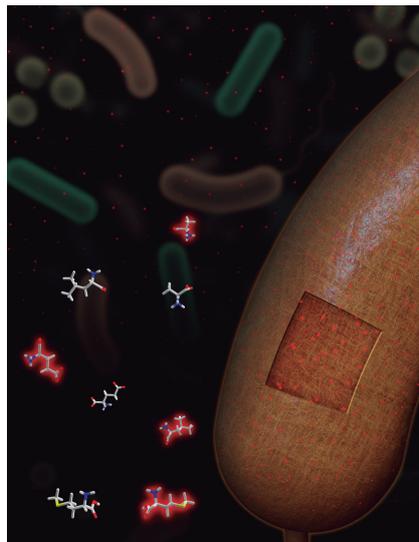


Felipe Cava - Premio Jaime Ferrán 2017

*The laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), Department of Molecular Biology, Umeå University, 90187, Umeå, Suecia.*

Uno de los aspectos de la microbiología que me cautivó desde muy joven fue la facilidad insultante que tienen las bacterias para colonizar prácticamente cualquier ambiente imaginable. Al contrario que los humanos, la evolución ha dotado a estos seres microscópicos con unos atributos metabólicos tales que les permite expandir sus poblaciones y sobrevivir en una gran diversidad de escenarios. No obstante, no importa lo adverso que un ambiente sea, tanto las bacterias como los seres humanos no solemos vivir aislados. Como toda buena comunidad de vecinos que se precie, las comunidades microbianas también cuentan con individuos amistosos y los que no lo son tanto. En estas sociedades, establecer relaciones requiere siempre una cierta capacidad diplomática que terminará inevitablemente derivando en alianzas, indiferencia u hostilidad.

Una de las estrategias de socialización que las bacterias utilizan es la producción de efectores extracelulares (7), moléculas generalmente de pequeño tamaño que pueden actuar a distancia para modular la biodiversidad y el comportamiento de los organismos que cohabitan en un mismo nicho. Un tipo de efectores extracelulares son los D-amino ácidos, formas enantioméricas de los archiconocidos (L)-amino ácidos, constituyentes básicos de las proteínas en todos los reinos de la vida. En 2009, descubrimos que un gran número de bacterias no relacionadas filogenéticamente secretaban niveles altos de D-aminoácidos al medio ambiente (6). Desde entonces, el número de laboratorios en todo el mundo interesados en conocer el impacto biológico y ecológico de estas moléculas no ha dejado de crecer. Sin embargo, a día de hoy apenas hemos comenzado a descubrir algunas de las, aparentemente muy numerosas, funciones reguladoras de estos efectores en la fisiología bacteriana (3).



Aunque desde hace varias décadas los científicos ya conocían de la existencia de los D-aminoácidos D-alanina y D-glutámico, éstos nunca habían valorado la posibilidad de que su función fuera otra que la de ser constituyentes del peptidoglicano, una estructura específica de las bacterias que envuelve a la célula y proporciona la forma y la resistencia al turgor interno (8). Sin embargo el agente etiológico de la enfermedad del cólera -*Vibrio cholerae*, además de producir D-Ala y D-Glu, libera concentraciones milimolares de D-metionina y D-leucina al medio extracelular (6). Dado que estos D-amino ácidos son diferentes de la D-Ala y D-Glu presentes en todas las paredes bacterianas, los llamamos D-amino ácidos no canónicos (NCDAA). Curiosamente, a diferencia de la D-Ala y el D-Glu, que son producidos por racemasas citoplasmáticas mono-específicas (5), tanto la D-Met como la D-Leu son producidos por una misma racemasa multispecífica (i.e., racemasa de amplio espectro, BsrV) que se localiza en el periplasma. Otra diferencia más de BsrV respecto a las racemasas de alanina y glutámico es que ésta

primera no es esencial. En *V. cholerae*, la producción de NCDAA se induce durante la fase estacionaria de crecimiento (2,6) y depende del factor sigma de respuesta a estrés RpoS.

Pero, ¿para que sirven los D-amino ácidos? Los NCDAA se incorporan en la estructura del peptidoglicano reemplazando la D-Ala terminal de los muropeptidos. Esta “edición” química genera un sustrato sub-óptimo que ralentiza la biosíntesis del peptidoglicano y permite con ello a la bacteria coordinar adecuadamente el metabolismo de la pared celular con el crecimiento de la población cuando los recursos nutricionales escasean (2,6).

Un momento clave en nuestra investigación fue cuando caracterizamos las propiedades bioquímicas y estructurales de la racemasa BsrV (4). Encontramos entonces que BsrV podía racemizar un número de aminoácidos (>10) muy superior a los 4 que originalmente detectamos en el medio extracelular de *V. cholerae* (D-Met, D-Leu, D-Val y D-Ile). ¿Cómo se explicaba esto? Como sucede a menudo en ciencia, el descubrimiento de que *V. cholerae* liberaba D-Met y D-Leu al ambiente fue fortuito. El proyecto en su inicio consistía en identificar los determinantes genéticos que definían la morfología curvada de *V. cholerae*. En esta búsqueda encontramos que la mutación del gen *mrcA* que codifica la PBP1A en *V. cholerae*, una de las principales PBPs (del inglés, *penicillin binding proteins*) sintéticas, causaba un cambio de morfología sólo visible en fase estacionaria. Es decir, mientras que el mutante *mrcA* era perfectamente normal, al menos en forma, a la bacteria silvestre durante la fase exponencial, este bacilo curvado mudaba a forma cocoide en fase estacionaria. Razonamos que esta transición morfológica podía provenir de un estímulo ambiental. Identificamos entonces los D-amino ácidos D-Met y D-Leu en una fracción del sobre-

nadante de fase estacionaria de *V. cholerae* que resultó ser activa para inducir el cambio morfológico en el mutante *mrcA* (6). Este tipo de análisis era por supuesto sesgado porque sólo detectaba aquellos D-amino ácidos que inducían cambios en la forma de ese mutante en cuestión. Y dado que la pared es el principal determinante morfológico de la bacteria, tiene todo el sentido que la D-Met y la D-Leu fueran hallados en aquellas fracciones activas. Pero, tal y como era de esperar, un análisis químico del medio extracelular (no fraccionado) de *V. cholerae* reveló una acumulación elevada de muchos otros D-aminoácidos (como por ejemplo, D-Arg) (1). Ello nos hizo plantearnos que aunque los D-aminoácidos quizá compartan un propósito biológico último i.e., facilitar la adaptación de la bacteria a estrés, puede que usen distintas estrategias para lograrlo.

Para abordar esta cuestión, realizamos un estudio genético con el fin de identificar aquellas mutaciones que sensibilizaban a *V. cholerae* (normalmente resistente a los D-aminoácidos) frente a D-Met o D-Arg. Este experimento resultó ser muy ilustrativo porque dimos con mutaciones en genes asociados al metabolismo de la pared celular que hacían hipersensible a *V. cholerae* frente a D-Met pero no así frente a la D-Arg (1). Este resultado daba fuerza a la hipótesis que defendía que los D-amino ácidos pudieran desempeñar más de una función biológica.

A pesar de que la D-Arg es totalmente inocua para *V. cholerae*, este D-amino ácido es un potente compuesto bactericida para muchas especies bacterianas. Basamos en este hecho nuestra estrategia para investigar el mecanismo de acción de la D-Arg. Aunque volvimos a utilizar una aproximación genética, en este caso buscamos identificar mutaciones supresoras de la letalidad de la D-Arg. Utilizamos para ello dos especies bacterianas: *Caulobacter crescentus* y *Agrobacterium tumefaciens*. De esta forma no solo aumentábamos las posibilidades de éxito sino que además podríamos evaluar si ambas especies utilizaban el mismo mecanismo de resistencia o no. Sorprendentemente, las mutaciones en ambas bacterias apuntaron al sistema de

captación de fosfato (y no a la pared bacteriana), confirmando que los D-aminoácidos deben considerarse como efectores ambientales sin redundancia funcional (1).

El amplio espectro bactericida de la D-Arg hace de este D-aminoácido una poderosa arma química que bacterias productoras como *V. cholerae* pueden usar para competir con aquellos organismos que co-habitan en el mismo nicho. Siendo algo tan ventajoso llama la atención que no todos los vibrios codifiquen una racemasa de amplio espectro. Sin embargo, el que los NCDAs sean liberados al ambiente puede servir para que también los vibrios no productores pudieran beneficiarse de estas moléculas. De hecho, todos los vibrios son resistentes a los D-aminoácidos, independientemente de si codifican o no una racemasa de amplio espectro. Es por esto por lo que la D-Arg, por ejemplo, podría usarse como una estrategia cooperativa que permitiera defender a un grupo heterogéneo de vibrios y expandir sus poblaciones en ambientes polimicrobianos hostiles (1). De hecho, las especies de vibrio co-habitan en diversos nichos marinos y de agua dulce y, por lo tanto, pueden beneficiarse de la producción altruista de D-Arg por parte de unas pocas especies productoras.

Dado que las bacterias parecen generar sin gran problema mutaciones para sobreponerse a los efectos nocivos de los D-Arg y D-Met, es posible que la producción de distintos tipos de NCDAs dirigidos contra distintos tipos de procesos (dianas) celulares sirva para minimizar la emergencia de especies resistentes. La aplicación combinada de NCDAs bactericidas en terapias antimicrobianas tiene un gran potencial en el área clínica. Es más, D-amino ácidos afectando procesos no vitales como el biofilm, motilidad, secreción de toxinas o la esporulación pueden tener también un papel muy relevante en el control de la virulencia de bacterias patogénicas.

La abundancia de los L-aminoácidos existentes en un nicho en concreto junto con la diversidad de especies bacterianas productoras de racemasas multiespecíficas determinará en última instancia: i) la composición

y la cantidad de D-aminoácidos secretados y, ii) la biodiversidad, fisiología y comportamientos microbianos que se verán afectados en otros entornos. No obstante, todavía queda mucho por aprender a cerca del papel de los NCDAs en procesos como la señalización, el desarrollo y la interferencia metabólica, estudios que proporcionarán una información mecanística muy valiosa sobre la evolución de los ecosistemas microbianos.

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Sociedad Española de Microbiología (SEM) por la concesión del premio Jaime Ferrán 2017. La investigación en el Cava lab está financiada por la Fundación Knut and Alice Wallenberg (KAW), The Laboratory of Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), el Consejo Sueco de Investigación y la Fundación Kempe.

## REFERENCIAS

1. Alvarez, L., Aliashkevich, A., de Pedro, M.A., and Cava, F. (2017). Bacterial secretion of D-arginine controls environmental microbial biodiversity. The ISME journal.
2. Cava, F., de Pedro, M.A., Lam, H., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2011a). Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. The EMBO journal 30, 3442-3453.
3. Cava, F., Lam, H., de Pedro, M.A., and Waldor, M.K. (2011b). Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. Cellular and molecular life sciences : CMLS 68, 817-831.
4. Espaillet, A., Carrasco-Lopez, C., Bernardo-Garcia, N., Pietrosevoli, N., Otero, L.H., Alvarez, L., de Pedro, M.A., Pazos, F., Davis, B.M., Waldor, M.K., et al. (2014). Structural basis for the broad specificity of a new family of amino-acid racemases. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 70, 79-90.
5. Hernandez, S.B., and Cava, F. (2016). Environmental roles of microbial amino acid racemases. Environmental microbiology 18, 1673-1685.
6. Lam, H., Oh, D.C., Cava, F., Takacs, C.N., Clardy, J., de Pedro, M.A., and Waldor, M.K. (2009). D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. Science 325, 1552-1555.
7. Riley, M.A., and Wertz, J.E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. Annual review of microbiology 56, 117-137.
8. Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M.A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol Rev 32, 149-167.